



## **INDUÇÃO DE COMUNIDADE MICROBIANA HALOTOLERANTE EM ÁGAR MARINHO A PARTIR DE INÓCULO DE SOLO COMO POSSÍVEL AGENTE NA BIORREMEDIAÇÃO DE POLUENTES MARINHOS**

IVO, V.S.<sup>1</sup> MONTAGNOLLI, R.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - *campus* Araras

E-mail para contato do autor apresentador: [valeriaivo@estudante.ufscar.br](mailto:valeriaivo@estudante.ufscar.br)

### **RESUMO EXPANDIDO**

O contínuo despejo de lixo plástico nos oceanos tem gerado problemas ambientais sendo os microplásticos os mais prejudiciais encontrados. Os microplásticos são polímeros de até 5 mm de diâmetro capazes de afetar todo o ecossistema marinho. De acordo com Gesamp (2019) a quantidade de lixo plástico nos oceanos pode ser expressada como número ou massa (g ou kg) dividido por unidade de distância (m, km), área (m<sup>2</sup>, km<sup>2</sup>) ou volume (L<sup>1</sup>, m<sup>3</sup>), exemplo, número de partículas/m<sup>3</sup> de água no oceano. Através desse cálculo Moore (2008) diz que o acúmulo de plástico no oceano é de 60-80% chegando a 90-95% em algumas áreas. Esses dados motivaram uma crescente busca por soluções para minimizar os impactos causados por esse poluente. Uma das soluções mais viáveis para a remoção desse composto recalcitrante, de difícil degradação, é a biorremediação, cujo principal agente biológico são os microrganismos.

A exploração das rotas metabólicas e da diversidade enzimática dos microrganismos apontam para uma alta capacidade de adaptação deles a diferentes condições. Esse é um mecanismo fundamental para o consumo de substratos diversos, incluindo poluentes. Dentre os vários consórcios microbianos os microrganismos halofílicos possuem grande potencial biotecnológico sendo considerado o melhor candidato para a biorremediação em águas salinas (KANEKAR *et al.*, 2012) podendo adotar estratégias enzimáticas capazes de biodegradar compostos recalcitrantes como o plástico (PIUBELI, 2011). Um microrganismo que mostra bom desempenho na decomposição de microplásticos no ambiente marinho

é um fungo chamado *Zalerium maritimum* que se encontra nas costas portuguesas, espanholas e naturalmente degradam madeiras, mas caso a fonte de alimento seja escassa se alimentam do microplástico do tipo polietileno (FONTES *et al.*, 2019).

A capacidade de adaptação de microrganismos nas mais diversas condições têm sido muito estudado principalmente no solo que é considerado um ambiente heterogêneo e de acordo com Neves *et al.* (1992) é frequente a existência de microrganismos com plasticidade nutricional que podem mudar seu conjunto enzimático para sobreviver. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo a indução da halotolerância de comunidades microbianas do solo, submetidas a concentrações progressivas de cloreto de sódio (NaCl), para sobrevivência em alta salinidade em ambientes oligotróficos marinhos. Após isso, foi verificado o crescimento em um meio de cultura que simula o ambiente marinho e a seleção das colônias proeminentes.

Inicialmente, uma quantidade de solo seco foi coletado em uma mata nas coordenadas 22°18'23.78" S 47°23'12.28"O dentro do *campus* da UFSCar de Araras e foi peneirado e centrifugado usando o agitador orbital Shaker formando um caldo homogêneo para a obtenção dos microrganismos. Esse caldo microbiano foi induzido a concentrações cada vez maiores de NaCl. Foram feitas triplicatas começando em 0,075g de NaCl para 9mL de caldo nutriente e adicionado 1mL do caldo microbiano, depois de 48 horas no Shaker em temperatura de 30°C foi observado que a solução ficou turva indicando crescimento microbiano. Nas concentrações subsequentes de 0,15g, 0,225g e 0,3g de NaCl em caldo nutriente que em sua formulação contém, em 10mL de solução, 0,5g de cloreto de sódio teve se a última amostra com aproximadamente 3,5 g/mL (3,5%) equivalente ao valor encontrado no oceano. Com isso, foi possível atingir um ambiente marinho simulado final. Depois disso, foi usada a técnica de NMP (número mais provável) para facilitar o crescimento e seleção dos microrganismos. Foram feitas diluições de  $10^{-1}$  até  $10^{-5}$  nas amostras de concentrações salinas 3,5% sendo utilizado a com diluição de  $10^{-3}$  para crescimento em placa de Petri. Foi preparado o meio de cultura Ágar Marinho, tendo em sua formulação a mesma dosagem de cloreto de sódio (3,5g) e outras substâncias químicas como cloreto de cálcio, de potássio, de magnésio e sulfato de magnésio além de nutrientes como extrato de carne e de levedura e peptona e o ágar como veículo para solidificar a solução. Esses compostos representam os encontrados em ambiente marinho. A preferência sobre o uso de um meio de cultura e não de água coletada do mar foi para ter um melhor controle dos dados. A amostra com os microrganismos que sobreviveram em concentração 3,5% de NaCl foram pipetadas em três placas de Petri com Ágar Marinho e deixado em temperatura de 30°C por 48 horas para crescimento.

Após a incubação, foram obtidas duas colônias distintas, uma com coloração branca (AS1) e outra com coloração avermelhada (AS2). As colônias AS1 e AS2 possuem aspectos morfológicos de bactérias com formato irregular e elevado com bordas onduladas conforme a Figura 1.

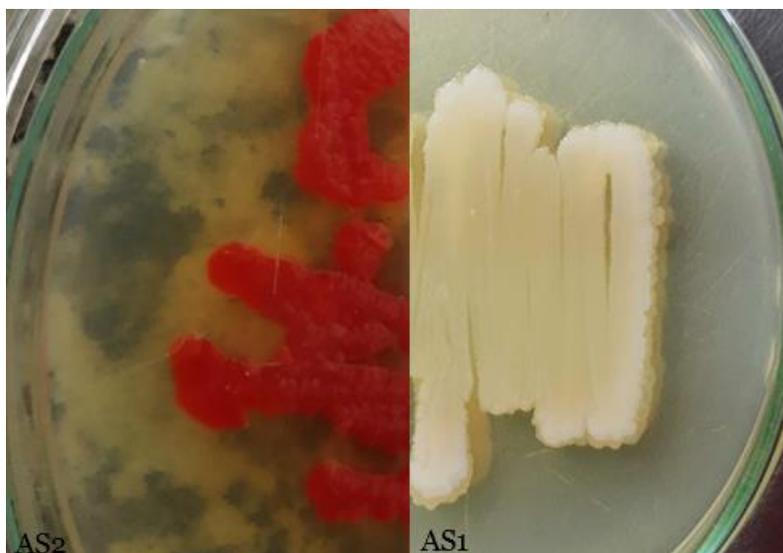


Figura 1 – Colônias AS1 (direita) e AS2 (esquerda) selecionadas do solo e crescidas em Ágar Marinho. Formato irregular e elevado com bordas onduladas.

Observou-se que as duas colônias possuem um comportamento semelhante e que a coloração é seu diferencial visível. A repetição dos ensaios indicou a persistência desses dois isolados, tendo prevalecido a colônia AS1 em 60% dos ensaios.

Foram realizados testes para determinar quanto tempo sobreviveriam no Ágar Marinho sem a reposição dos nutrientes. A primeira rodada de teste ocorreu 60 dias após o repique das primeiras amostragens e observou-se que as colônias AS1 e AS2 continham células viáveis e produção de biomassa.

Esse trabalho descreve o potencial de pesquisas subsequentes para a obtenção de microrganismos com um metabolismo adaptado para viver em um local com propriedades salinas e outros aspectos que favorecem sua sobrevivência no ambiente marinho. A aplicação dessas colônias selecionadas a biodegradar microplásticos é uma possibilidade viável para futuras etapas desta e de outras pesquisas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microrganismos de solo; Ágar Marinho; halofílicos.

## REFERÊNCIAS

FONTES, B. C. et al. **Biorremediação de microplásticos com a colaboração do fungo *Zalerium maritimum***. São Paulo: Revista UNILUS Ensino e Pesquisa, v.17, n. 41, p.132, 2019.

GESAMP. **Guidelines or the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean** (Kershaw P.J., Turra A. and Galgani F. editors), (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 99, p. 130, 2019.

KANEKAR, P. et al. **Halophiles – Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications** [S.I.:

*s.n.*], DOI: 10.1007/978-94-007-2229-3\_1, 2012.

MOORE, C. J. **Synthetic Polymers in the Marine Environment: A Rapidly Increasing, Long-Term Threat**. [*S.I:* *s.n.*], v.108, n.2, p.131-139, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.025>. Acesso em: 10 abr. 2020.

NEVES, M. C. P. *et al.* **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 29-30, 1992.

PIUBELI, F. A. **Caracterização da Comunidade Microbiana em Ambientes Salinos e Suas Possíveis Aplicações Biotecnológicas**. São Paulo: [s.n.],p. 240, 2011.